

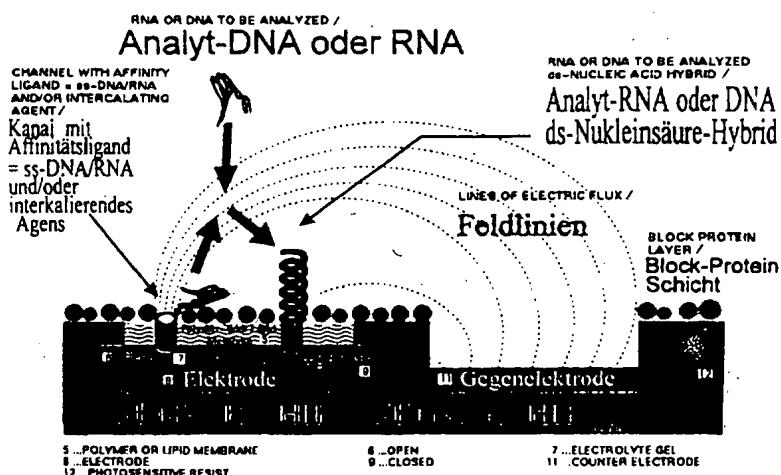


(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : G01N 27/327, C12Q 1/00	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 97/20203
		(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 5. Juni 1997 (05.06.97)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/AT96/00230	(81) Bestimmungsstaaten: US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).
(22) Internationales Anmeldedatum: 21. November 1996 (21.11.96)	
(30) Prioritätsdaten: A 1943/95 28. November 1995 (28.11.95) AT A 485/96 14. März 1996 (14.03.96) AT	Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i>
(71)(72) Anmelder und Erfinder: SCHALKHAMMER, Thomas [AT/AT]; A-3072 Kasten Nr. 105 (AT). PITTNER, Fritz [AT/AT]; Khekasse 40-42/11, A-1230 Wien (AT).	

(54) Title: NOVEL MEMBRANES AND MEMBRANE DNA/RNA SENSORS

(54) Bezeichnung: NEUARTIGE MEMBRANEN UND MEMBRAN-DNA/RNA-SENSOREN



(57) Abstract

The invention concerns a novel highly sensitive membrane sensor which, in particular using a novel membrane structure. Either the interaction between lipid layers is reinforced, using the reaction between organoboron compounds, and/or stable lipids of the general formulae according to figure 4 are used. This novel sensor is designed as a hybridization-controlled membrane channel biosensor. The membrane channel biosensor uses the bonding of DNA and RNA to an immobilized catcher oligonucleotide to control a membrane channel.

Document AC

Cited in IDS for 06510-118US1

USSN 09/466,994, Filed 12/10/99

(57) Zusammenfassung

Es wird ein neuartiger hochsensitiver Membransensor beschrieben, der insbesondere unter Nutzung eines neuartigen Membranaufbaus, wobei entweder die Interaktion von beliebigen Lipidschichten unter Nutzung der Wechselwirkung von Organoborverbindungen verstärkt wird und/oder stabile Lipide der allgemeinen Formeln nach Figur 4 verwendet werden, als Hybridisierungs-gesteuerter Membrankanalsensor, welcher die Bindung von DNA und RNA an ein immobilisiertes Fängeroligonukleotid zur Steuerung eines Kanals in einer Membran nutzt, konstruiert ist.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AM	Armenien	GB	Vereinigtes Königreich	MX	Mexiko
AT	Osterreich	GE	Georgien	NE	Niger
AU	Australien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BB	Barbados	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BE	Belgien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BF	Burkina Faso	IE	Irland	PL	Polen
BG	Bulgarien	IT	Italien	PT	Portugal
BJ	Benin	JP	Japan	RO	Rumänien
BR	Brasilien	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
BY	Belarus	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CA	Kanada	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korsika	SG	Singapur
CG	Kongo	KZ	Kasachstan	SI	Slowenien
CH	Schweiz	LI	Liechtenstein	SK	Slowakei
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CM	Kamerun	LR	Liberia	SZ	Swasiland
CN	China	LK	Litauen	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
EE	Estland	MG	Madagaskar	UG	Uganda
ES	Spanien	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	MN	Mongolei	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MR	Mauritanien	VN	Vietnam
GA	Gabon	MW	Malawi		

Neuartige Membranen und Membran-DNA/RNA-Sensoren

Die Erfindung bezieht sich auf die Konstruktion eines Membran-basierenden Sensortyps, welcher durch Verwendung neuartiger Membran- und Membran-Traeger-Systeme und/oder durch Nutzung der Nukleinsäure-Hybridisierung zum Bau von insbesondere DNA- und RNA-Sensoren geeignet ist.

Als Nachweissysteme für beliebige biologische Moleküle sind Enzymsensoren bekannt, die die katalytische Wirkung von Biomolekülen verwenden, um ein spezifisches Biosignal z.B. die Konzentration von Milchsäure, Zucker, Aminosäuren,... in ein unspezifisches chemisches Signal z.B. Konzentration von Wasserstoffperoxid umzuwandeln, welches sodann elektrochemisch in eine elektrische Größe umgewandelt wird, die der gesuchten Analytkonzentration proportional ist. Als Nachweissysteme für DNA und RNA sind Enzymmarkierte Assays (Northern-, Southern-Blott, PCR + ELISA,...) bekannt, die die katalytische Wirkung von Enzymen verwenden, um ein spezifisches Biosignal d.h. die Hybridisierung von DNA und RNA mit Hilfe eines z.B. Enzymlabels in ein unspezifisches chemisches Signal z.B. Konzentration von oxidiertem ABTS, in p-Nitrophenylphosphat, Indigoblau,... umzuwandeln, welches sodann elektrochemisch oder optisch ausgewertet wird. Es ist bekannt, daß diese Assays eine gute Sensitivität jedoch grundlegende Probleme durch unspezifische Hybridisierung und komplizierte Durchführung aufweisen. Als Nachweissysteme für DNA und RNA sind weiters optische Systeme wie Surface Plasmon Resonance - Sensoren bekannt, welche die Hybridisierung von DNA und RNA auf einem Sensorchip in ein optisches Signal umzuwandeln vermögen. Es ist jedoch weiters bekannt, daß der große apparative Aufwand und die im Vergleich zu den Enzymassays mäßige und daher für viele Anwendungen nicht ausreichende Empfindlichkeit dieser Sensoren diese Technik nur für manche Bereiche einsetzbar macht.

Die Erfindung zielt darauf ab, durch einen neuen Sensorprinzip und/oder einer neuartigen selektiven Membran die grundlegenden Einschränkungen insbesondere in der Nukleinsäureanalytik zu beseitigen. Die essentielle Biokomponente soll in diesem Sensoraufbau nicht zur katalytischen Verstärkung der Analytbindung Verwendung finden, sondern als selektive Barriere zur umgebenden Lösung. Der Analyt z.B. DNA oder RNA dient sodann direkt oder indirekt zur Steuerung des Ionenkanals. Durch diesen Ionenkanal können pro Sekunde und Kanal bis zu 10 Millionen Ionen in einen schmalen ($< 10 \mu\text{m}$) Membran-Elektrodenraum einfließen und dieser Ionenfluß direkt elektrochemisch (etwa 1-10 pA je offener Kanal), konduktometrisch, fluorimetrisch oder mit einer anderen geeigneten Methode bestimmt werden. Eine Störung des Meßsignals durch andere Komponenten der Lösung wird durch die selektive Membran unterdrückt. Die vorliegende Erfindung nutzt die genaue Immobilisierung eines kleinen Oligonukleotids und/oder einer interkalierenden Substanz am Eingang des Kanals. An diese wird anschließend der große Analyt (z.B. DNA oder RNA) am Kanaleingang selektiv gebunden.

Die vorliegende Erfindung unterscheidet sich von US 5,234,566 durch den Aufbau und die Verankerung der Membranen. Auch ist die Aufbringung der Membran nicht nur durch „self assembling“ möglich, sondern kann auch durch andere Techniken erfolgen (z.B. LB-Filme).

Die vorliegende Erfindung unterscheidet sich von EP 0 441 120 A2 durch die nicht notwendige Vernetzung der Lipidmembran mit der Elektrodenoberfläche durch überbrückende Moleküle. Der dauernde Kontakt mit zwei wasserigen Phasen ober- und unterhalb der Membran (Zeichen einer nicht stabilen Membran), ist kein notwendiger Teil der vorliegenden Erfindung. Die Verwendung einer Rahmenstruktur, über die sich die Lipidmembran weitererstreckt, vermeidet apolare Wände, an die die Lipidmembran grenzt, welche instabile und daher un dichte Stellen der Membran darstellen würden.

Die vorliegende Erfindung beinhaltet nicht die in WO 94/07593 geforderte direkte Vernetzung der Lipidmembran mit der Elektrodenoberfläche unter Verwendung überbrückender Linkerlipide oder den zwangsweisen Einbau von Ionophoren.

Der neuartige Membranaufbau beruht auf folgenden Erkenntnissen:

Als Ionenkanäle können z.B. die sehr gut untersuchten und leicht zugänglichen Kanalpeptide der Gramicidinfamilie als Basis des neuen Hybridisierungssensors dienen. Sowohl die Sequenzen als auch genaue Moleküldaten unterschiedlicher Gramicidinderivate konnten in den letzten Jahren bestimmt werden. Die Sequenzhomologien sind durchwegs hoch. Die Ionenkanäle werden dabei durch 2 assoziierte Moleküle Gramicidin gebildet. Die Raumstruktur des Peptids ist dabei eine 6.3 bzw. β -Helix, die zentral einen offenen Ionenkanal bildet und mit Tryptophanresten an den beiden Membranseiten dynamisch verankert ist.

Es konnte durch Patch Clamp Techniken gezeigt werden, daß an beiden Seiten der Membran Gramicidin - Monomere eingeschraenkt frei floaten. Kommt es zu einer Assoziation zweier Molekülen Gramicidin von unterschiedlichen Membranseiten, so bildet sich ein durchgängiger Ionenkanal. (siehe Fig. 1). Chemische Modifikationen der Gramicidinpeptide am N - Terminus können nach Deformylierung zwei Moleküle Gramicidin zu einem kovalenten Dimer (z.B. mit Oxalsäure oder Malonsäure als Bisamide) verknüpfen. Diese Gramicidin-Dimere bilden z.B. die im Sinne der Patentanmeldung notwendigen stabilen Ionenkanäle in natürlichen und artifiziellen Membranen. Öffnet oder schließt sich ein einzelner Ionenkanal in der Membran, so kann dies direkt durch einen Ionenstrom von etwa 10 Millionen Ionen je Sekunde durch den Membrananal gemessen werden. Bisgramicidinmoleküle sind als Ionenkanäle im Sinne der Patentanmeldung besonders gut geeignet durch ihre hohe Stabilität, die gute chemische Charakterisierung, die Möglichkeit einer Vielzahl chemischer Modifikationen und insbesondere durch die hohe Leitfähigkeit der Kanäle.

Die zweite Teil des neuartigen Sensorkonzepts ist die Membrantechnologie. Es wird dabei der Vorteil der „black lipid membranes“ d.h. der freie Zugang zu beiden Membranseiten mit dem Vorteil der „self assembling membranes“ d.h der stabilen Anordnung eines selbst aufbauenden Lipidfilms kombiniert. Die Wahl eines Photo- oder Elektropolymers als Traegermatrix für den Lipidfilm und die kovalente Kopplung der Lipidmonomere an diese Geloberfläche stabilisiert den Lipidfilm gegen mechanische Zerstörung, bzw. gegen das Flattern des zweiten Lipidfilms der Doppelmembran.

Dünnschichttechnologische Verfahrensschritte sind ein weiterer wichtiger Teil im Rahmen des Sensoraufbaus. Dabei soll zuerst der elektrochemische Sensor nach etablierten dünnschichttechnologischen Verfahren gefertigt werden. Sodann wird mit Photolacken z.B aus der AZ - Serie (z.B. AZ 1505) die Rahmenstruktur für den Lipidfilms aufgebaut. Der nächste Schritt ist sodann die Füllung der hydrophoben Rahmenstruktur mit einem hydrophilen Gel Photopolymer als Traegersystem für die Lipidmembran. Diese beiden Schritte können technologisch vorteilhaft auch in umgekehrter Reihenfolge ausgeführt werden.

Die Kopplung des Faengeroligonukleotids an den Gramicidin Kanal erfolgt durch selektive chemische Modifikation der carboxyterminalen Struktur.

Die Erfindung zielt darauf ab, eine neuartiges, hochsensitives Sensorprinzip mit der Erfassung einzelner Moleküle zu schaffen. Die Empfindlichkeit wird real durch die Bindungskonstante (z.B. DNA/DNA bzw. RNA/DNA) und durch den Zeitbedarf des Aufeinandertreffens der beiden Nukleinsäuremoleküle begrenzt.

Weiters zielt die Erfindung auf den Aufbau solcher Sensoren mit Dünnschichttechnologie-kompatiblen Methoden wie Dünnschichtsubstraten, Sputtern und Aufdampfen der Metallelektronen, Einsatz von Photolacken und mit photosensitiven Polymeren hergestellten, dünnschichttechnologischen Lipidmembranträgern ab und beinhaltet darüber hinaus auch den neuartigen Aufbau von Lipid- oder Polymermembranen an Phasengrenzflächen.

Die DNA-Analytik stellt immer größere Anforderungen an die Selektivität und Sensitivität von Meßsystemen. Schnellere und insbesondere einfachere Testverfahren in der DNA-Diagnostik ermöglichen vielfach erst die routinemäßige Bestimmung von Tumorgenen, Viren, Erbkrankheiten,... in der Arztpraxis oder zumindest abseits etablierter Universitätskliniken. Darüber hinaus kann auch die direkte Messung durch den Patienten neuartige Möglichkeiten eröffnen.

Der Einsatz des neuen Sensortyps ermöglicht die Nutzung der Fähigkeit zur Hybridisierung von Analyt-DNA und -RNA mit Faengeroligonukleotiden am Sensorkopf. Der Einsatz der neuen Membranen ermöglicht den Aufbau neuer Sensortypen unter Nutzung nahezu aller biochemischer und chemischer Affinitätsreaktionen. Ein solcher Sensor kann

z.B. nach folgenden Arbeitsschritten aufgebaut werden: Chemische Synthese eines selektiven Membrananals, dünnenschichttechnologischer Sensoraufbau, Polymermembranaufbau, Lipidcoating, Einbau der Membrankanaele und Assemblieren. Eine Kombination der erfindungsgemaessen Verfahrensschritte kann zu einem Sensoraufbau nach folgendem Konzept fuehren:

- * Synthese eines Ionenkanals z.B. Bisgramicidin A
- * Kovalente Kopplung von Oligonukleotiden an oder nahe dem Kanaleingang,
- * Sensoraufbau mit Dünnschichttechnologie,
- * Membrancoating des Sensors,
- * Einbau der Faengeroligonukleotid-modifizierten Ionenkanaele,
- * Einbau in ein Gehaeuse.

Die Kopplung des Faengeroligonukleotids an das carboxyterminale Ethanolamin (des Gramicidin A) erfolgt durch Aktivierung der beiden freien terminalen OH - Gruppen des Moleküls mit z.B. Divinylsulfon, Chlorameisensaeure-nitrophenylester, oder durch Umwandlung in eine Jod- bzw. Brom-Gruppe. Sodann kann das linkermodifizierte Oligonukleotid durch seine terminale NH₂ bzw. SH Gruppe selektiv gebunden werden. Es koennen auch beide terminalen OH - Gruppen des Bisgramicidins mit Divinylsulfon oder Chlorameisensaeure-nitrophenylester aktiviert und mit einem Diamin (Ethylendiamin) oder einer Dimercaptoverbindung umgesetzt werden. Das sich durch die Umsetzung bildende Bisgramicidinderivat traegt sodann zwei terminale reaktive Amino (oder SH)- Gruppen. Die Kopplung der Faengeroligonukleotide ist unter Beispiele beschrieben.

Die Fertigung der Sensorschips folgt dann dem Schema der aufgelisteten Beispiele.

Der Traeger der Lipid- oder Polymermembran baut sich aus zwei unterschiedlichen photostrukturierbaren Polymeren auf : Einer Rahmenstruktur aus hydrophobem d.h. lipophilem Photolack und einem hydrophilen Photopolymer innerhalb der Rahmenstruktur als Membrantraeger.

Die Rahmenstruktur aus hydrophobem d.h. lipophilem Photolack kann durch photostrukturierbare Polymere aus der Halbleiterindustrie aufgebaut werden. Es eignen sich dafür die etablierten Photolacke vom Typ AZ (Hoechst), die durch nachfolgendes Einbacken bei Temperaturen über 150 Grad voellig vernetzen und daher voellig unloeslich werden. Ausgehend von den in den letzten Jahren entwickelten hydrophoben Photolacken aus der Halbleiterindustrie koennen analog auch hydrophile Polymersysteme aufgebaut werden. Dabei koennen hydrophile Polymervorstufen durch bivalente Photovernetzer kovalent verbunden werden. Es bildet sich ein Polymernetzwerk mit steuerbarer Porengröße, welches als strukturierbares Traegermaterial zur Immobilisierung von Membranen und Ionenkanaele dient. Insbesondere Polyvinylpyrrolidonpolymere mit hydrophilen Seitengruppen koennen als viskose Loesungen durch Spinnprozesse auf die

Sensorrohlinge aufgebracht werden und durch Photocrosslinker (meist Carben und Nitren - Bildner z.B. 4,4'-Bisazidostilben-2,2'-disulfonsaeure) mit langwelligem UV (360 nm) zu Polymerfilmen vernetzt werden. Die reaktiven funktionellen Gruppen des Polymers koennen dann aktiviert und zur Kopplung von Proteinen, Peptiden und Lipiden verwendet werden. Da Lipidfilme sowohl untereinander als auch an der Zellwand nicht durch kovalente Wechselwirkungen gebunden sind, koennen sie leicht unter desintegrierenden Bedingungen extrahiert werden. Dazu eignen sich hydrophobe Agenzien, Detergentien und Alkalien.

Zum Aufbau einer stabilen Lipidmembran müssen zwei grundsätzliche Probleme gelöst werden : Stabile Bindung des Lipidfilms an die Unterlage und das Verhindern des Abfloatens des oberen Lipidfilms im Lipiddoppellayer. Die stabile Bindung des unteren Lipidfilms an die Geloberfläche erfolgt durch hydrophobe, ionische oder kovalente Kopplung von z.B. Thiolipiden an eine chemisch reaktive Oberfläche. Dabei wird vor der Aufbringung des Thio-Lipidfilms auf die Oberfläche dieselbe in folgender Weise modifiziert : Einführung reaktiver Gruppen (z.B. durch Sauerstoff- oder Chlorplasma) und Kopplung der reaktiven Gruppen mit bivalenten Crosslinkern wie z.B. Divinylsulfon. Der in der genannten Weise aktivierte Sensor wird in ein Bad mit in organischem Lösungsmittel gelösten Thio - Lipiden getaucht, es erfolgt das „self assembling“ und die kovalente Bindung des Lipidfilms. Ein Anteil an frei beweglichen Lipiden ermöglicht die fluide Struktur der Lipidmembran.

Bei Verwendung von nicht bolaamphiphilen Esterlipiden - analog eukaryontischen Zellen - muss der zweite Lipidfilm am Ersten kovalent gebunden verankert werden.

Die Verwendung der neuartigen zyklischen Transmembranlipide ersetzt eine herkömmliche Doppellayermembran. Die zyklischen Lipide koennen in einer optimierten Synthese mit hoher Ausbeute gewonnen werden (meist 10 - 50 %). Die Lipide weisen ähnliche aber optimierte Struktur wie Tetraetherlipide aus manchen insbesondere thermophilen Bakterienmembranen auf. Der Aufbau als makrozyklisches Ringsystem ermöglicht eine hohe Stabilität und große thermische Belastbarkeit. Weiters ist ein Coating mit einem einzelnen Tauchvorgang durch eine Lipidgrenzschicht möglich. Insbesondere die Kombination mit Boronsäuren optimiert zusätzlich die Haftung jeder Lipidmembran an einer meist hydrophilen Oberfläche. Dabei kommt es zu einer Wechselwirkung von Organoboronsäuren mit vicinalen cis-Diolen der jeweils anderen Phase. Diese Art der Haftungsverstärkung ist den anderen insbesondere durch den geringen Platzbedarf des Bors überlegen, da dadurch die Lipidphase in keiner Weise verzerrt wird.

Die stabile Haftung des Lipidfilms an der Geloberfläche erfolgt durch hydrophobe, ionische oder kovalente Wechselwirkung der Lipide mit der Supportoberfläche. Dabei kann vor der

Aufbringung des Lipidfilms die Oberflaeche des Supports z.B. durch Einführung reaktiver OH - Gruppen unter Anwendung von Sauerstoffplasma für die Interaktion mit Boronsaeure-modifizierten Lipiden aktiviert werden. Der in der genannten Weise aktivierte Sensor wird sodann in ein Bad mit in organischem Loesungsmittel geloesten Lipiden getaucht, es erfolgt der Aufbau der Membran. In analoger Weise kann die Aufbringung der Lipide auch durch Tauchen in einem LB-Trog mit gespreiteten Lipiden erfolgen. Der LB-Trog wird dabei im Autopressure-Modus betrieben und der Druck im Bereich der semifluiden bzw. kristallinen Modifikation gehalten. Der Support wird langsam durch die Lipidgrenzschicht geführt, wobei sich die Membran an dessen Oberflaeche ausbildet.

Ein zweiter Lipidfilm wird nicht benoetigt, da die neuartige Membran bereits eine Doppel lipidlayer ersetzen kann. Ein Anteil an frei beweglichen Lipiden kann der Membran bei Bedarf zugesetzt werden und ermoeglicht den Übergang von einer semikristallinen zu einer fluiden Struktur der Lipidmembran.

Der Einbau des DNA/RNA-modifizierten Kanals erfolgt zugleich mit dem „self assembling“ des Lipidfilms. Ein Liganden - modifiziertes Bisgramicidin besitzt noch eine freie reaktive Gruppe am zweiten Carboxyterminus des Bisgramicidinmoleküls. Diese kann in analoger Weise wie die Lipide kovalent mit der Geloberflaeche koppeln und so den Kanal fest (d.h. kovalent) mit dem Traegerpolymer verbinden.

Der Lipidfilm kann jedoch auch durch eine beliebige andere Membran ersetzt werden, da es im Sensor-Setup die Aufgabe der Membran ist, zwei unterscheidbare Kompartimente zu schaffen. Analog der Technologie ionensensitiver Elektroden kann z.B. Polyvinylchlorid mit hohem Weichmacheranteil als Membranmatrix verwendet werden. Auch hydrophobe Schichten z.B. aus Teflon, durch Plasmapolymerisation aufgebracht, eignen sich als Membranmatrix. Durch Leitfaehigkeit und Impedanz kann die Ausbildung von Inhomogenitaeten und die Dichtheit der Lipidmembranschichten auf Metalloberflaechen direkt beobachtet und quantifiziert werden.

Leitfaehigkeits- und Strommessungen aehnlich der Patch Clamp Messung an Ionenkanälen in intakten Zellen oder an Membranfragmenten sind das Meßprinzip des Membranalbionensors. Die in der genannten Weise aufgebauten Sensoren liefern als z.B. Mikroleitfaehigkeitsbiosensoren ein dem Ionenfluß proportionales Stromsignal. Als Meßaufbau sind mit Elektrometerverstaerkern (z.B. OPA 111 oder 128 Burr Brown) ausgestattete Verstaerker geeignet. Auch alle Meßplaetze für Einzelionenkanalmessungen in der Patch Clamp Technik im Bereich bis 0.1 pA sind für die neuartigen im Rahmen der Erfindung beschriebenen Sensoren geeignet.

Die Erfindung wird nachfolgend an Hand von Ausführungsbeispielen naeher erlaeutert .

Beispiel 1 : Aufbau der Sensorsubstrate

Verwendung von Sensorsubstraten aus Alkali-, Pyrex-Glas, Aluminiumoxid oder Kunststoff (z.B. Polyimid)

- Herstellung von Photomasken über CAD, DXF - File und Patterngenerator
- Herstellung von Tochtermasken
- Hochvakuumbedampfung bzw. Sputtern der Elektroden
- 50 nm Titan, 100 nm Gold,
- Anlage : Balzers, ESQ 110, BB800 059BD mit 270°

Elektronenstrahlumlenkkonone bei $2 \cdot 10^{-5}$ Torr, 150°C 1 nm/s
bzw. Laboranlage der Fa. Balzers

- Photolack AZ5218 E, positiv 4000 rpm, 30 s
- Mask-aligner : Karl Süss Modell MA 45, 360 nm 350 W , 7.5 s
- Photolack - Entwickler AZ - Developer / Hoechst 60 s
- Einbacken bei 120°C , 30 min
- Gold aetzen mit KI/I₂
- Titan aetzen mit gepufferter HF
- 30 min, 80°C, Ultraschall mit AZ - Remover
- Ethanol Waschschnitt
- Kaschieren auf Haftfolie
- Saegen der Wafer mit 100 µm Diamantsaege

Beispiel 2 : Reinigung des Gramicidin A

Gramicidin A wird von Gramicidin B und C aus der Mischung (= Gramicidin D) auf einer SI - 100 Polyol Saeule der Firma Serva mit einem Gradient von 0 - 80 % Methanol getrennt.

Beispiel 3 : Carboxyterminale Modifikation des Gramicidins

500 mg Gramicidin A werden mit 10 ml Benzol gerührt, ein 3 - 5 facher Überschuß des Carboxylgruppen modifizierten Liganden zugegeben und mit 10 fachem molaren Überschuß eines Carbodiimids (z.B. Dicyclohexylcarbodiimid) versetzt. Die Reaktion wird bei Raumtemperatur im Dunkeln vorgenommen. Der Verlauf der Reaktion wird auf Siligagel - Platten mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie (Chloroform / Methanol / Wasser : 100/10/1) verfolgt.

Das Reaktionsgemisch wird sodann auf einer praeparativen C-18 Reversed Phase Saeule mit Methanol / Wasser gereinigt.

Beispiel 4 : Synthese des Bisgramicidins

Das Ausgangsprodukt ist desformyliertes Gramicidin A welches durch Spaltung von Gramicidin A mit wasserfreier Salzsaeure in Methanol und nachfolgende Reingung in praeparativen C-18 reversed phase Saeulen mit Methanol / Wasser synthetisch gewonnen wird.

Die Dimerisierung des desformylierten Gramicidin A erfolgt durch Zusatz eines 5 fachen molaren Überschusses von Diphenylphosphorylazid zu einer Loesung von einem molaren Teil des desformylierten Gramicidin A's und einem Überschuß der Dicarbonsaeure 3 - 10 fach (z.B. Oxalsaeure, Malonsaeure) in Dimethylformamid unter -10°C. Die Reaktionsdauer bei 0 °C betraegt 24 - 48 Stunden. Nach Stoppen der Reaktion mit Ethanol wird das Reaktionsgemisch nach einigen organisch / waessrigen Extraktionsschritten zur Trockene eingeengt und nach Aufnehmen des Rückstands in einer kleinen Menge Methanol auf einer praeparativen C-18 Reversed Phase Saeule mit dem Laufmittelsystem Methanol / Wasser (90 / 10 bis 95 / 5) gereinigt.

Beispiel 5 : Aufbau der Rahmenstruktur

- * Der Photolack AZ 1505 wird durch Spincoaten auf den Sensorchip aufgebracht (7000 rpm, 2 min).
- * Softbake bei 80 °C für 30 Minuten
- * Belichtung mit Photomaske mit UV (365 nm) 5 s
- * Postbake bei 80 °C für 5 Minuten
- * Entwickeln mit einer 2.83% Tetraethylammoniumhydroxid-Loesung 60 s
- * Curing : 1 h auf 160 °C

Beispiel 6 : Aufbau des hydrophilen Lipidtraegerpolymers

Das hydrophile photovernetzte Gel wird nach folgender Vorschrift aufgebaut :
2.5 % (w/v) PVP (Polyvinylpyrrolidon MW : 360.000 oder 1.000.000) in destilliertem Wasser und 0.75 % (w/v) 4,4'-Diazidostilben-2,2'-disulfonsaeure in destilliertem Wasser werden gemischt (3:2 v/v). Die Praepolymerloesung wird entweder in die Photolackrahmenstruktur pipettiert oder der Sensor wird durch ein Eintauch- oder Spinbeschichtungsverfahren mit der Praepolymerloesung überzogen.
Das Photopolymer wird durch Belichten mit einer 50 W Quecksilberdampflampe für 5 s durch Einwirken von UV-A und UV-B gehaertet und überschüssiger Vernetzer durch einen Waschschnitt in Phosphatpuffer 0.1 M, pH = 7.0 entfernt.

Beispiel 7: Reinigung von Platinsensorelektroden

Nach der Verwendung von loeslichen Thio-Verbindungen sind Metalloberflaechen chemisch bzw. elektrochemisch blockiert = derivatisiert. Um die kovalente Bindung der Thiole mit der Elektrodenoberflaeche zu brechen, wird die Elektrode elektrochemisch zwischen -600 und +1200 mV (bis in den Bereich der Sauerstoffentwicklung) versus Ag/AgCl gereinigt. Die elektrochemische Reinigung erfolgt durch Anlegen einer zeitlich variablen Spannung an einen in neutralen Puffer eingetauchten Sensor.

Beispiel 8 : Lipid- und Kanalbeschichtung der Sensorelektroden

Die in einem organischen Loesungsmittel geloesten Lipide (2-30 µg /100 cm² Oberflaeche) und modifizierte-Ionenkanaele (10 - 10⁸ Moleküle / mm²) werden an einer Luft/Flüssigkeit-Phasengrenze auf einem LB-Trog gespreitet. In einem automatisierten LB-System wird der Lipidfilm von einer fluiden in eine semikristalline Phase komprimiert. Der Sensor wird sodann durch den Lipidfilm gezogen wobei ein Nanoaktuator der Firma Physik-Instrumente/Deutschland (von einem DC-Motor mit der Aufloesung von 60nm angetrieben) verwendet werden kann.

Ungesaettigte Lipidfilme werden mit einer Photomaske bedeckt und durch das Licht einer 50W Mitteldruck Quecksilberdampflampe etwa 120 Sekunden vernetzt. Dabei werden die Lipide sowohl innerhalb der Lipidschicht als auch mit einem reaktiven Traeger vernetzt. Der Einbau modifizierter Kanaele kann in analoger Weise mit Mischungen aus Lipid und Kanalpeptiden erfolgen.

Beispiel 9 : Kopplung von SH-Oligonukleotiden an ein NH₂-Kanalpeptid

Ein Kanalpeptid mit reaktiver NH₂ -Gruppe (20mg/ml) wird in Phosphatpuffer 0.1 M / EDTA 0.1 M geloest (bei hydrophoben Peptiden unter Zugabe eines Loesungsvermittlers) und 0.5-5mg/ml Sulfosuccinimidyl-(4-jodacetyl)aminobenzoat zugegeben. Die Reaktionsdauer betraegt bei Raumtemperatur und unter Lichtschutz 20-60 Minuten. Nach der Abtrennung des Kopplungsreagenzes durch HPLC wird ein 1-5 fach molarer Überschuß an SH-modifiziertem Oligonukleotid zugegeben. Die Reaktionsdauer betraegt bei 4°C und unter Lichtschutz 8 -16 Stunden. Als Reaktionsloesung kann ein Phosphatbuffer 0.1 M mit 0.1 M EDTA pH = 8.3 verwendet werden. Der Überschuß an reaktivem Kanalpeptid wird mit Cystein abgefangen und die Mischung auf einer semipräparativen HPLC-Saeule gereinigt.

Beispiel 10 : Kopplung von NH₂-Oligonukleotiden an ein SH-Kanalpeptid

Ein Oligonukleotid mit reaktiver, terminaler NH₂ -Gruppe (20mg/ml) wird in NaHCO₃ 0.2 M / EDTA 0.1 M, pH = 9.3 geloest (bei hydrophoben Peptiden unter Zugabe eines Loesungsvermittlers) und 0.5-5mg/ml Sulfosuccinimidyl-4N-maleimidomethyl cyclohexan-1-

carboxylat zugegeben. Die Reaktionsdauer betraegt bei Raumtemperatur und unter Lichtschutz 10-30 Minuten. Nach der Abtrennung des Kopplungsreagenzes durch HPLC wird ein 1-5 fach molarer Überschuß an SH-modifiziertem Kanalpeptid zugegeben. Die Reaktionsdauer betraegt bei 4°C und unter Lichtschutz 8 -16 Stunden. Als Reaktionsloesung kann ein Phosphatbuffer pH=7.0, 0.1M mit 0.1M EDTA, verwendet werden. Der Überschuß an reaktivem Kanalpeptid wird mit Cystein abgefangen und die Mischung auf einer semipräparativen HPLC-Säule gereinigt.

Beispiel 11 : Kopplung von NH₂-Oligonukleotiden an ein NH₂-Kanalpeptid
Ein Oligonukleotid mit reaktiver, terminaler NH₂ -Gruppe (20mg/ml) wird in 0.2 M NaHCO₃ pH = 9.3 gelöst (bei hydrophoben Peptiden unter Zugabe eines Lösungsmittlers) und 1-5mg/ml Bis(sulfosuccinimidyl)suberat zugegeben. Die Reaktionsdauer betraegt bei Raumtemperatur und unter Lichtschutz 5-20 Minuten. Nach der Abtrennung des Kopplungsreagenzes durch HPLC wird ein 1-5 fach molarer Überschuß an NH₂-modifiziertem Kanalpeptid zugegeben. Die Reaktionsdauer betraegt bei 4°C und unter Lichtschutz 8-16 Stunden. Als Reaktionsloesung kann 0.2 M NaHCO₃ pH = 9.3 verwendet werden. Der Überschuß an reaktivem Kanalpeptid wird mit Cystein abgefangen und die Mischung auf einer semipräparativen HPLC-Säule gereinigt.

Beispiel 12: Oligonukleotide für einen Herpes-Virus Sensor

Als Fängeroligonukleotide werden komplementäre Sequenzen von 15-30 bp zu Sequenzen aus der Viruspolymerase auf einem Oligonukleotidsynthesizer gewonnen. Als Sequenzen werden komplementäre Sequenzen zu den Nukleotidsequenzen die den folgenden Aminosäuresequenzen entsprechen verwendet:

Herpes I:	PAGPRGAGRG ERPEEEGEDE
Herpes II:	PHNPRGATQT GDGNGDEDLD
Humaner Herpes VI:	RILPRGIMHD RQGIGYKGAT
Cytomegalovirus:	PGSAQGSGKR VSPGSGSNSS
Varicella-Zoster:	RGSNREFLHS DVIPDVGVDVE
Epstein-Barr:	LRLIPKCFQT ILPMPSASDR

Beispiel 13: Oligonukleotide für einen HIV1/2-Virus Sensor

Als Faengeroligonukleotide werden komplementaere Sequenzen von 15-30 bp zu Sequenzen aus dem Protein gp41 auf einem Oligonukleotidsynthesizer gewonnen. Als Sequenzen werden komplementaere Sequenzen zu den Nukleotidsequenzen die den folgenden Aminosaeuresequenzen entsprechen verwendet:

HIV1: LGLWGCGSKLIC
 LGMWGCGSKLIC
HIV2: LNSWGCAFRQVC

Beispiel 14: Aufbau einer Elektropolymermembranmatrix mit substituierten Polypyrrolen

Als Monomer koennen z.B.

1-Carboxyalkyl-pyrrol,

2-(1-Pyrroloacetyl)-glycin,

1-Alkylpyrrol,

4-Carboxybenzylpyrrol,

4-Nitrophenylpyrrol,

4-(3-Pyrrolo)-4-ketobuttersaeure,

3-((Keto-4-nitrophenyl)methyl)pyrrol oder analoge Verbindungen verwendet werden.

Die Monomere werden in 0.5 prozentiger Loesung in Acetonitril gelöst und 2.5 % Leitsalz (LiClO_4 , NR_4BF_4 , NR_4PF_6 , R=Alkyl) zugegeben. Die klare Loesung wird 10 Minuten mit Argon gespült. Dann werden die Elektroden cyclovoltammetrisch mit den Elektropolymeren überzogen (Scangeschwindigkeit = 100mV/s). Der Spannungsbereich wird dabei so gewaehlt, daß eine deutliche anodische Stromzunahme durch den Polymerisationsvorgang waehrend der ersten Zyklen beobachtet werden kann z.B. -300 bis 1400 mV versus Ag/AgCl.

Beispiel 15 : Reduktion von 1,24-Tetracosandisaeure (Figur 2)

Ansatz 1: 0.005 mol 1,24-Tetracosandisaeure (2 g)

0.0083 mol LiAlH_4 (8.3 ml einer 1M Lösung in THF)

60 ml Pyridin getrocknet über Molekularsieb 4Å

Die Tetracosandisaeure wird in 60 ml trockenem Pyridin gelöst, das LiAlH_4 unter Röhren zugetropft. Anschließend wird die Reaktionslösung 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wird auf Eiswasser gegossen, der Niederschlag abgenutscht, mit 3N HCl, H_2O und gesättigter NaCl Lösung gewaschen und aus Toluol umkristallisiert. Um den Erfolg der Reaktion zu überprüfen, wird eine Dünnschichtchromatographie durchgeführt.

Laufmittel: Toluol/Dioxan/Essigsaeure = 90/25/4

Sprühreagens: Vanillin-Schwefelsaeure:

1g Vanillin wurde in 100 ml Schwefelsaeure gelöst.

Anschließend wird auf 160°C erhitzt, bis Verfaerbung eintritt.

Zur Strukturbestaetigung kann ein NMR- oder Massenspektrum aufgenommen werden.

Ausbeute: 1.035 g (= 56% der Theorie)

Beispiel 16 : Synthese von Bis-(2-butendicarboxysaeure)-1,24-tetracosandiylester (Figur 2).

Ansatz: 0.002 mol Maleinsaeureanhydrid (0.196 g)

0.001 mol 1,24-Tetracosandiol (0.37 g)

Das Reaktionsgemisch wird in 6 ml trockenem Toluol (über Molekularsieb 4Å) mindestens 8 h refluxt. Beim Abkuhlen faellt das Produkt aus. Um den Erfolg der Reaktion zu überprüfen, kann eine Dünnschichtchromatographie (Kieselgelplatte mit Fluoreszenzindikator 254 nm) durchgeföhrt werden.

Laufmittel: Toluol/Dioxan/Essigsaeure = 90/25/4

Detektion: UV-Lampe, 254 nm

Ausbeute: 0.45 g (80% der Theorie)

Beispiel 17 : Synthese von 1,6,31,36 Tetraoxacyclohexaonta-3,33 dien-2,5,32,35 teton (Figur 2)

Ansatz: 0.0005 mol

Bis-(2-butendicarboxysaeure)-1,16-hexadecadiylester (0.283 g)

0.0005 mol 1,24-Hexadecadiol (0.185 g)

0.05 g p-Toluolsulfonsaeure

Das Reaktionsgemisch wird in 45 ml Toluol unter Rückfluß mindestens 8 h gekocht. Das Lösungsmittel wird abgedampft und der Rückstand aus Ethylacetat umkristallisiert. Der Umsatz kann mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie (Kieselgelplatte mit Fluoreszenzindikator 254 nm) verfolgt werden.

Laufmittel: Toluol/Dioxan/Essigsaeure = 90/25/4

Detektion: UV-Lampe, 254 nm

Beispiel 18 : Synthese von Bis-(2-butendicarboxysaeure)-1,16-hexadecadiylester (Figur 3)

Ansatz: 0.0116 mol Maleinsaeureanhydrid (1.14 g)

0.0058 mol 1,16-Hexadecadiol (1.5 g)

Das Reaktionsgemisch wird in 35 ml trockenem Toluol (über Molekularsieb 4Å) mindestens 8 h refluxt. Beim Abkühlen fällt das Produkt aus. Um den Erfolg der Reaktion zu überprüfen, kann eine Dünnschichtchromatographie (Kieselgelplatte mit Fluoreszenzindikator 254 nm) durchgeführt werden.

Laufmittel: Toluol/Dioxan/Essigsäure = 90/25/4

Detektion: UV-Lampe, 254 nm

Ausbeute: 2.27 g (87% der Theorie)

Beispiel 19 : Synthese von 1,6,23,28 Tetraoxacyclotetratetraonta-3,25dien-2,5,24,27 teton (Figur 3)

Ansatz: 0.0022 mol

Bis-(2-butendicarboxysäure)-1,16-hexadecadiylester (1 g)

0.0022 mol 1,16-Hexadecadiol (0.57 g)

0.22 g p-Toluolsulfonsäure

Das Reaktionsgemisch wird in 200 ml Toluol unter Rückfluß mindestens 8 h gekocht. Das Lösungsmittel wird abgedampft und der Rückstand aus Ethylacetat umkristallisiert. Um den Erfolg der Reaktion zu überprüfen, wird eine Dünnschichtchromatographie (Kieselgelplatte mit Fluoreszenzindikator 254 nm) durchgeführt.

Laufmittel: Toluol/Dioxan/Essigsäure = 90/25/4

Detektion: UV-Lampe, 254 nm

Ausbeute: 0.32 g

Patentansprüche:

1. Biosensor, dadurch gekennzeichnet, daß in Membranen Kanäle oder kanalbildende Moleküle eingebaut sind, an welchen entweder kovalent ein oder mehrere Oligonukleotide, Oligonucleotidanaloga, DNA- oder RNA-Moleküle immobilisiert sind oder der Aufbau der Membranen so vorgenommen wird, daß eine für Ionen impermeable Schicht aus Lipidmolekülen an eine für Ionen oder Moleküle mit einem Molekulargewicht kleiner als 1500 Dalton permeable Schicht angelagert ist, wobei entweder die Interaktion der beiden Schichten unter Nutzung der Wechselwirkung von Organoborverbindungen, bevorzugt Boronsäuren und deren Derivaten, verstärkt wird oder stabile Lipide der allgemeine Formel I verwendet werden, aber auch mit Vorteil die oben genannten Strukturelemente des Membranbiosensors kombiniert eingesetzt werden.

2. Biosensor nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Membran aus Lipiden aufgebaut ist, in welchen die Transmembranketten der Lipide nach Figur 4 durch die Linker Z₁ und Z₂ verbunden sind, wobei die Kettenlänge der Transmembranketten n bevorzugt gleich m ist, die Transmembranketten länger als 11 Atome sind, die Transmembranketten aus den Elementen X_a und/oder X_b, gewählt aus der Gruppe CH₂, CH-Alkyl, C(Alkyl)₂, CF₂, O, S, C=O, p-Phenyl, aufgebaut sind und die terminalen funktionellen Gruppen Z₁ und Z₂ beliebige organische oder siliciumorganische Linker sind, wobei der Abstand der Kette X₁ von der Kette X₂ weniger als die Länge einer Kette von 6 Kohlenstoffatomen beträgt, die Linker entweder hydrophil sind oder eine reaktive Gruppe zur Kopplung an andere Moleküle tragen, bevorzugt bis zu drei Kohlenstoffatome lang sind und bevorzugt aus der Gruppe Oxalsäure, Malonsäure, Maleinsäure, Bernsteinsäure, Glutarsäure, Phtalsäure und deren Derivaten gewählt werden,

3. Biosensor nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Lipide der Membran nach Figur 4/I durch Linker verbunden sind, welche bis zu drei Kohlenstoffatome lang sind und eine oder mehrere Seitengruppen mit hydrophilen oder polaren Resten bevorzugt Organoborsäurederivate und/oder Organosilane tragen.

4. Biosensor nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Membran über Metall- oder Halbleiterelektroden direkt oder mit einem Submembranvolumen von weniger als 3 cm³ auf dem Sensorsubstrat angebracht ist, wobei die aufgebrachten Elektroden durch Dünnschichttechnologie, Dickschichttechnologie oder aus dünnen gewalzten Metallfolien gefertigt sind.

5. Biosensor nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Membran durch wasserhaltige und/oder leitfähige kovalent oder ionisch vernetzte Polymere, Biopolymere, Gele, Dendrimere oder kristalline Festkörper getragen wird.

6. Biosensor nach Anspruch 1 und 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Membran auf den wasserhaltigen und oder leitfaehigen kovalent oder ionisch vermetzten Polymeren, Biopolymeren, Gelen, Dendrimeren oder kristallinen Festkoerpern kovalent gebunden ist.
7. Biosensor nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß er einen Rahmen für die Membran aufweist, der durch Photostrukturieren einer Dünnschicht von Polymeren, Glaesem, Keramiken, Kohlenstoff, Metallen oder Halbleitern erzeugt ist.
8. Biosensor nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß Kanalmoleküle aus Peptiden oder Proteinen verwendet werden.
9. Biosensor nach Anspruch 1 und 8, dadurch gekennzeichnet, daß als Kanaele Peptidkanaele mit einer 6.3 Helix verwendet werden.
10. Biosensor nach Anspruch 1, 8 und 9, dadurch gekennzeichnet, daß als Kanaele Peptidkanaele aus Gramicidinen, modifizierten Gramicidinen und deren kovalent verknüpften Dimeren insbesondere N-terminal verknüpften Dimeren verwendet werden.
11. Biosensor nach Anspruch 1 und 8, dadurch gekennzeichnet, daß als Kanaele kovalent vermetzte Alamethicin Kanaele verwendet werden.
12. Biosensor nach Anspruch 1 und 8, dadurch gekennzeichnet, daß als Kanaele stabile monomere Bakterientoxine verwendet werden.
13. Biosensor nach Anspruch 1 und 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Liganden am oder nahe dem Carboxyterminus des Kanalpeptids gebunden sind.
14. Biosensor nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als Kanaele synthetische zyklische Peptide oder zyklische aus Zuckereinheiten aufgebaute Moleküle wie hydrophob modifizierte Cyclodextrine verwendet werden.
15. Biosensor nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß er als Kanaele Loecher in einer Membran aufweist.
16. Biosensor nach Anspruch 1 und 15, dadurch gekennzeichnet, daß eine Membran mit Loechem, hergestellt durch radioaktiven Beschuß der Membran, durch naßchemisches AeÄzen, durch Plasmaetzen, durch Aufbau einer Isolationsschicht um leitende Inseln, mit nanotechnologischen Scannern oder Stempeltechniken, verwendet wird.
17. Biosensor nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Membran auf einer Seite von einer waessrig/organischen oder organischen oder siliziumorganischen Flüssigkeit bedeckt ist.
18. Biosensor nach Anspruch 1 und 17, dadurch gekennzeichnet, daß in der organischen oder siliziumorganischen Flüssigkeit Salze oder Ionencarrier gelöst sind.
19. Verfahren zur Bestimmung der Konzentration von DNA und RNA mit Hilfe eines Biosensors nach den Ansprüchen 1,4 und 5, dadurch gekennzeichnet, daß die durch die Hybridisierung in den Membrankanaelen hervorgerufene ÄAenderung des Ionen- und/oder Elektronenstroms gemessen wird.

20. Verfahren nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß zur Verstärkung der kanalstromaendernden Wirkung der Hybridisierung DNA- und/oder RNA-interkalierende Substanzen eingesetzt werden.

21. Verfahren nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß zur Verstärkung der kanalstromaendernden Wirkung der Hybridisierung DNA- und/oder RNA-bindende Proteine eingesetzt werden.

22. Verwendung des Biosensors nach Anspruch 1 zur Bestimmung humaner, pflanzlicher, tierischer, viraler oder bakterieller DNA und RNA.

23. Verwendung des Biosensors nach Anspruch 1 zum Nachweis von Viren der Herpes und HIV Gruppe.

24. Biosensor nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Membran zusätzlich zu Lipiden nach Figur 4/I auch andere lipophile Komponenten in die Membran eingebaut sind, insbesondere um dadurch deren Eigenschaften wie Schmelzbereich, Phasenbildung, Fluidität und Lösungsverhalten zu modulieren.

25. Biosensor nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die zur Verstärkung der Haftung vorgeschlagene Verwendung von Organoborverbindungen durch Verwendung von Boronsäure-derivatisierten Lipiden und einem Hydroxylgruppen-enthaltenden Trägermaterial vorgenommen wird.

26. Biosensor nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die zur Verstärkung der Haftung vorgeschlagene Verwendung von Organoboronverbindungen durch Verwendung von Boronsäure-derivatisierten Trägermaterialien und Hydroxylgruppen-enthaltenden Lipiden vorgenommen wird.

27. Biosensor nach Anspruch 1 und 25 oder 1 und 26, dadurch gekennzeichnet, daß die Hydroxylverbindungen vicinale Diolstrukturen aufweisen.

28. Biosensor nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Lipide nach Figur 4/I, bevorzugt jedoch Lipide nach Figur 4/II und Figur 4/III verwendet werden.

29. Biosensor nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die beiden Transmembranketten der Lipide nach Figur 4/I durch Linker verbunden sind, welche reaktive Boronsäure- oder Siliziumderivate tragen.

30. Biosensor nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die beiden Transmembranketten der Lipide nach Figur 4/I durch Linker aus Maleinsäureestern verbunden sind.

31. Biosensor nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die beiden Transmembranketten der Lipide nach Figur 4/I durch Linker aus Maleinsäureestern verbunden sind und diese durch Polymerisation hochmolekulare, polymere Lipide formen.

32. Biosensor nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die beiden Transmembranketten der Lipide nach Figur 4/I durch Linker aus Maleinsäureestern

verbunden werden, welche danach durch Oxidation mit z.B. Osmiumtetroxid in vicinale cis-Diole umgewandelt werden.

33. Biosensor nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die cis-Diole mit Boronsaeuren der benachbarten Schicht Addukte bilden.

34. Biosensor nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die beiden Transmembranketten der Lipide nach Figur 4/I durch Linker aus Maleinsaeureestern verbunden werden, welche danach durch Addition von Thiolen, beispielsweise Hydroxyalkylthiolen oder Mercaptopropylsilanen derivatisiert oder vernetzt werden.

35. Biosensor nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die beiden Transmembranketten der Lipide nach Figur 4/I durch Linker aus Maleinsaeureestern verbunden werden, welche danach durch Addition von Borverbindungen, insbesondere Borhalogeniden derivatisiert werden.

Ionenfluß modulierender Peptidkanal-DNA/RNA-Biosensor

DNA - Analyt

Lipidmembran

$$\Delta U = 150 \text{ mV}$$

Bisgramicidin A
Ionenkanal +
ss-DNA oder RNA

Ionen : Na^+ , K^+ , H^+ ...



Ionenfluß modulierender Peptidkanal-DNA/RNA-Biosensor

DNA - Analyt

Hoechst-33258

AU = 150 mV

Lipidmembran

Bisgramicidin A
Ionenkanal

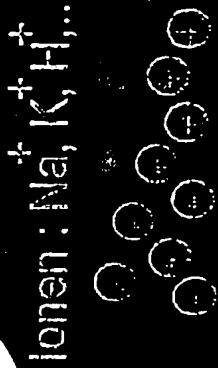
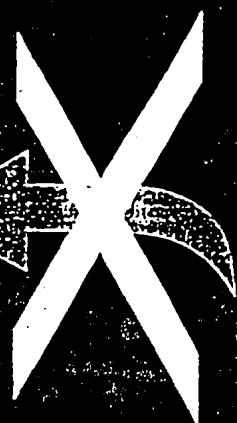
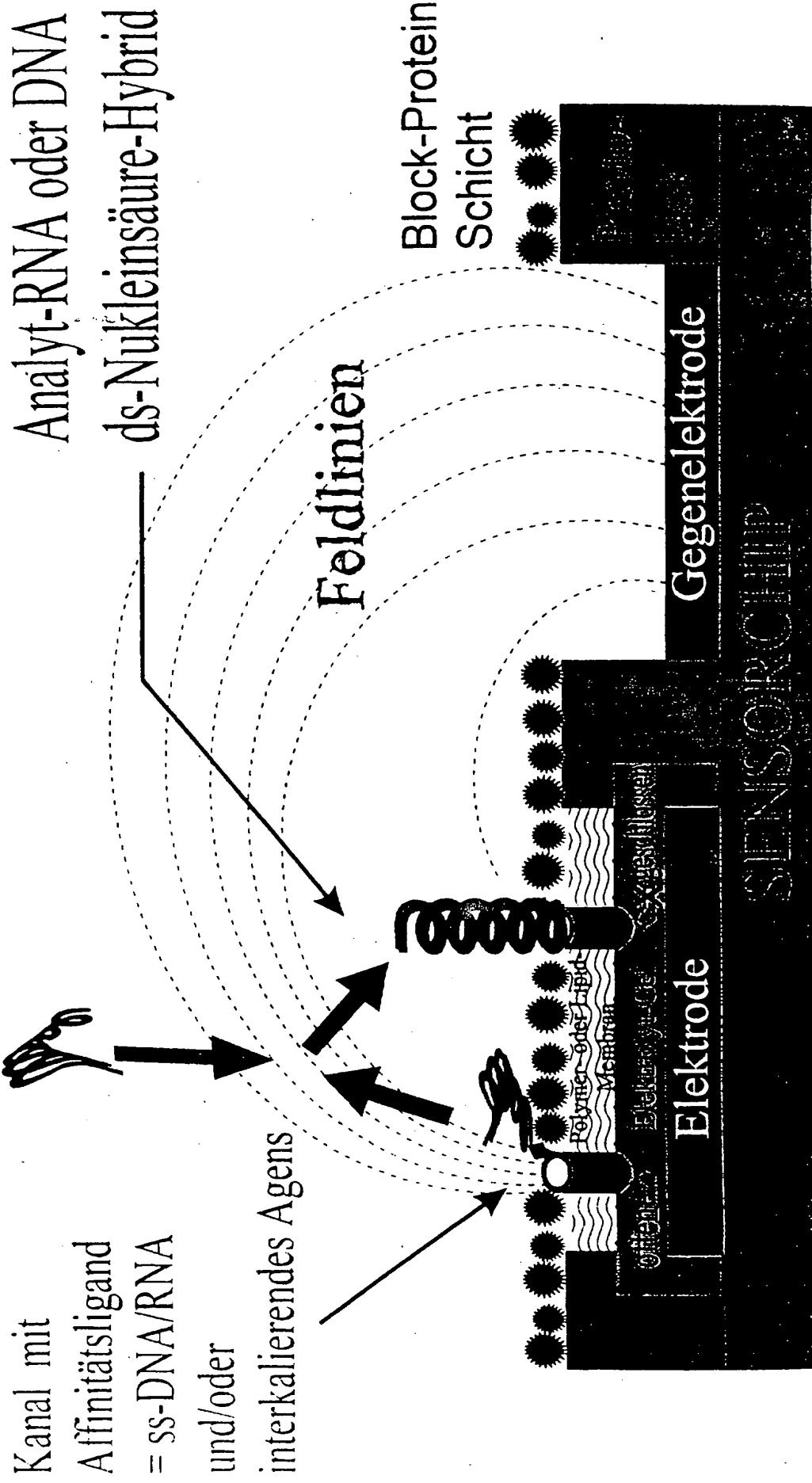


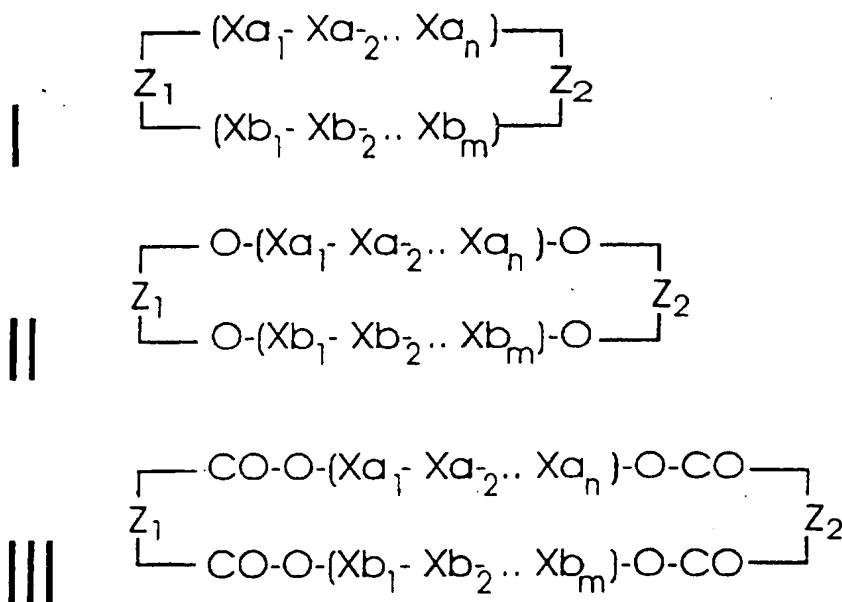
Fig. 3

Analyt-DNA oder RNA



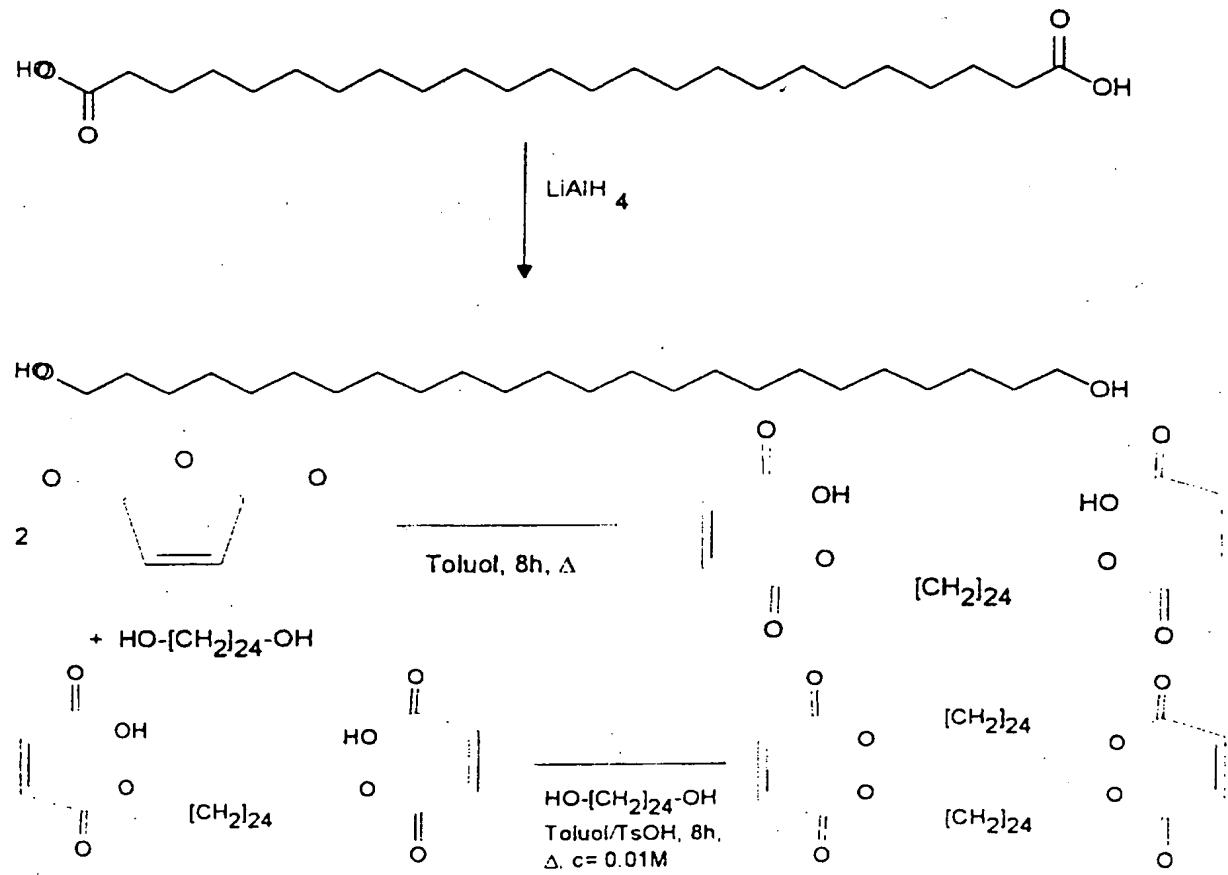
- Fig. 4 -

Formeln I, II und III:



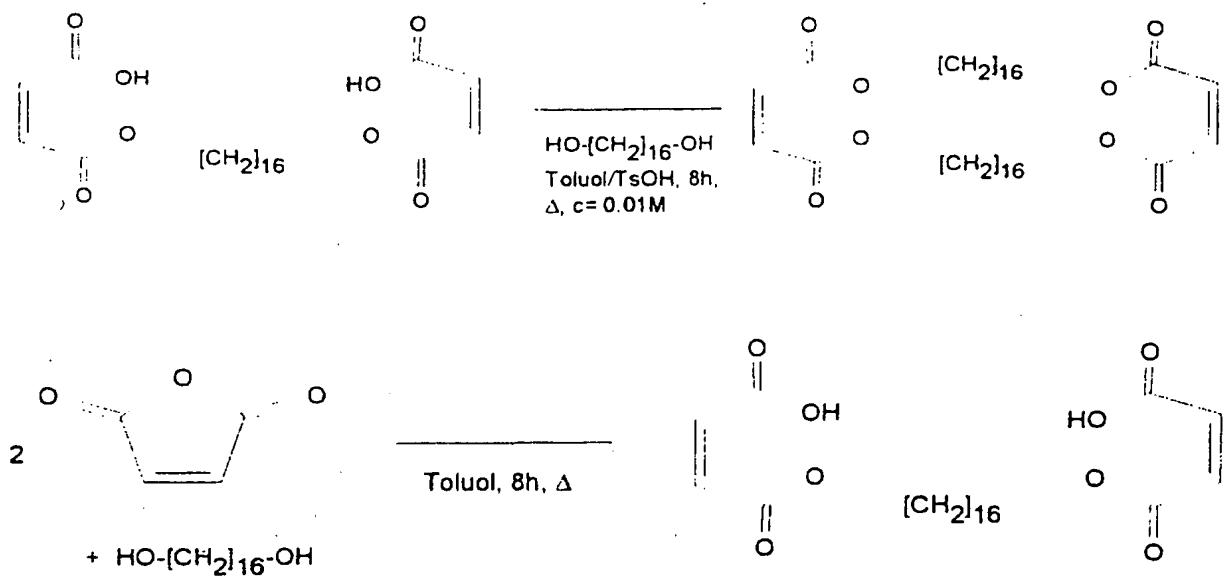
- Fig. 5 -

Reaktionsgleichung:



- Fig. 6 -

Reaktionsvorschrift:



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/AT 96/00230

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 IPC 6 G01N27/327 C12Q1/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
 IPC 6 C12Q G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 89 01159 A (COMMW SCIENT IND RES ORG) 9 February 1989 see the whole document	1,19
A	US 4 388 166 A (SUZUKI SHUICHI ET AL) 14 June 1983 see the whole document	1,19
A	DE 40 27 728 A (BAYER AG) 5 March 1992 see the whole document	1,19
A	EP 0 441 120 A (YEDA RES & DEV) 14 August 1991 cited in the application see the whole document	1,19

	-/-	

 Further documents are listed in the continuation of box C. Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- *&* document member of the same patent family

1

Date of the actual completion of the international search

24 February 1997

Date of mailing of the international search report

5 -03- 1997

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentzaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Moreno, C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/AT 96/00230

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5 234 566 A (OSMAN PETER D J ET AL) 10 August 1993 cited in the application see the whole document -----	1,19

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Int'l	Application No
PCT/AT 96/00230	

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 8901159 A	09-02-89	AT 113724 T AU 2127988 A CA 1335879 A DE 3852036 D DE 3852036 T EP 0382736 A JP 3503209 T US 5436170 A	15-11-94 01-03-89 13-06-95 08-12-94 09-03-95 22-08-90 18-07-91 25-07-95
US 4388166 A	14-06-83	JP 1365389 C JP 56027643 A JP 61029667 B EP 0025110 A	26-02-87 18-03-81 08-07-86 18-03-81
DE 4027728 A	05-03-92	AT 135745 T DE 59107591 D WO 9204465 A EP 0546032 A JP 6500465 T	15-04-96 25-04-96 19-03-92 16-06-93 20-01-94
EP 0441120 A	14-08-91	IL 93020 A AT 130938 T AU 625017 B AU 6924591 A CA 2033776 A DE 69114870 D DE 69114870 T ES 2082867 T JP 6090736 A US 5204239 A	29-06-95 15-12-95 25-06-92 11-07-91 10-07-91 11-01-96 29-08-96 01-04-96 05-04-94 20-04-93
US 5234566 A	10-08-93	AT 136119 T AU 4078789 A WO 9002327 A CA 1315338 A DE 68926118 D DE 68926118 T EP 0432188 A	15-04-96 23-03-90 08-03-90 30-03-93 02-05-96 22-08-96 19-06-91

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PL/AT 96/00230

A. KLASSEFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 G01N27/327 C1201/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchiert Mindestprulstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 6 C12Q G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprärußstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Liebete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 89 01159 A (COMMW SCIENT IND RES. ORG) 9. Februar 1989 siehe das ganze Dokument ---	1,19
A	US 4 388 166 A (SUZUKI SHUICHI ET AL) 14. Juni 1983 siehe das ganze Dokument ---	1,19
A	DE 40 27 728 A (BAYER AG) 5. März 1992 siehe das ganze Dokument ---	1,19
A	EP 0 441 120 A (YEDA RES & DEV) 14. August 1991 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	1,19
	-/--	

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

- Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- A' Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- E' älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- L' Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- O' Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- P' Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
- T' Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- X' Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- Y' Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann nahelegend ist
- & Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Absenderdatum des internationalen Recherchenberichts

24. Februar 1997

- 5 -03- 1997

Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax (+ 31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Moreno, C

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PL, AT 96/00230

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	US 5 234 566 A (OSMAN PETER D J ET AL) 10. August 1993 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument -----	1,19

1

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichten Dokumenten, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/AT 96/00230

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 8901159 A	09-02-89	AT 113724 T AU 2127988 A CA 1335879 A DE 3852036 D DE 3852036 T EP 0382736 A JP 3503209 T US 5436170 A	15-11-94 01-03-89 13-06-95 08-12-94 09-03-95 22-08-90 18-07-91 25-07-95
US 4388166 A	14-06-83	JP 1365389 C JP 56027643 A JP 61029667 B EP 0025110 A	26-02-87 18-03-81 08-07-86 18-03-81
DE 4027728 A	05-03-92	AT 135745 T DE 59107591 D WO 9204465 A EP 0546032 A JP 6500465 T	15-04-96 25-04-96 19-03-92 16-06-93 20-01-94
EP 0441120 A	14-08-91	IL 93020 A AT 130938 T AU 625017 B AU 6924591 A CA 2033776 A DE 69114870 D DE 69114870 T ES 2082867 T JP 6090736 A US 5204239 A	29-06-95 15-12-95 25-06-92 11-07-91 10-07-91 11-01-96 29-08-96 01-04-96 05-04-94 20-04-93
US 5234566 A	10-08-93	AT 136119 T AU 4078789 A WO 9002327 A CA 1315338 A DE 68926118 D DE 68926118 T EP 0432188 A	15-04-96 23-03-90 08-03-90 30-03-93 02-05-96 22-08-96 19-06-91